

烟草提取物对十一种植物病原真菌的抑制作用

段苏珍^{1,2}, 杜咏梅¹, 侯小东¹, 李丹丹¹, 任夏¹, 董维杰^{1,2}, 赵维¹, 张忠锋^{1*}

¹中国农业科学院烟草研究所 烟草行业烟草病虫害监测与综合治理
重点开放实验室, 青岛 266100; ²中国农业科学院研究生院, 北京 100081

摘要: 采用菌丝生长速率法研究烟叶 95% 乙醇提取物和正己烷提取物对苹果腐烂病菌等 11 种植物病原真菌的抑菌活性, 并通过液相色谱及气质联用色谱对烟叶提取物中多酚类、黄酮类、萜烯类等抑菌活性成分进行测定。实验结果表明, 0.5 g/mL (工作浓度 5 mg/mL) 的两种溶剂提取物对 11 种病原真菌的菌丝生长均有抑制作用, 其中对苹果腐烂病菌 (*V. mali*) 的抑制作用最强, 且同浓度的正己烷提取物的抑菌活性优于 95% 乙醇提取物。根据不同材料提取物及几种纯物质溶液的抑菌特点, 推测西柏三烯二醇可能是烟叶提取物中主要的抑菌活性物质。

关键词: 烟叶提取物; 植物病原真菌; 抑菌活性; 西柏三烯二醇

中图分类号: S435.6

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.03.021

Inhibitory Effects of Tobacco Extracts on Eleven Phytopathogenic Fungi

DUAN Su-zhen^{1,2}, DU Yong-mei¹, HOU Xiao-dong¹, LI Dan-dan¹,
REN Xia¹, DONG Wei-jie^{1,2}, ZHAO Wei¹, ZHANG Zhong-feng^{1*}

¹Laboratory of Tobacco Pest Monitoring and Comprehensive Sciences, Tobacco Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Qingdao 266100, China; ²Graduate School of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

Abstract: The antifungal activities of 95% ethanol and hexane extracts of tobacco against *Valsa mali* and other 10 plant pathogens were studied. The antimicrobial-components of tobacco extracts were measured by HPLC and GC-MS. Results showed that the 2 investigated solvent extracts both had inhibitory effects on all the tested plant pathogens, among which *V. mali* received strongest inhibition, and hexane extracts had stronger antifungal activity than 95% ethanol extract at the same concentration level. According to the antifungal characteristics of different extracts of tobacco and several pure substances, it was speculated that cembranoids were the main antifungal substance.

Key words: tobacco extracts; plant pathogenic cembranoids fungi; antifungal activity; cembranoids

自 20 世纪 40 年代以来, 化学农药因其品种多、见效快、使用方便、价格低等特点而在农药市场中占据主导地位。然而由于人们对化学农药的不合理使用和农药本身固有的缺点, 致使化学农药在使用中产生了环境污染、人畜中毒、农药残留等问题^[1], 给人们的健康带来隐患。为此, 人们将目光投向植物来源的抑菌活性物质。国内外大量现代烟草化学资料证明烟草 (*Nicotiana tabacum*) 中含有丰富的茄尼醇、绿原酸、芸香苷、生物碱等具有抑菌作用的活性物质。郭毅等人^[2]研究表明烟草中提取的茄尼醇对金黄色葡萄球菌及枯草芽孢杆菌有强烈的抑制作

用; 胡尚勤研究表明烟草提取物烟碱对病原菌如金黄色葡萄球菌、溶壁微球菌等抑菌作用明显^[3]。尚未见有关烟叶提取物对植物病原真菌抑制作用及其主要化学成分的研究报道。为探索烟草提取物对植物病原真菌的抑菌活性特点, 充分利用我国丰富的烟草资源, 拓展其应用领域, 作者对正己烷和 95% 乙醇烟叶提取物的抑菌效果及其主要抑菌活性成分进行了初步的研究。

1 材料与方法

1.1 供试材料

烟草样品: 选取净叶黄品种鲜烟叶及 CF87、FC8 (04-5002)、革新 3 号品种大田生长成熟期 (打顶后 60 d) 鲜烟叶样品, 45 °C 烘干、粉碎, 过 40 目筛 (孔径 0.37 mm), 置于干燥器中保存备用。

收稿日期: 2014-07-30 接受日期: 2014-09-30

基金项目: 中国农业科学院基本科研业务预算增量项目 (2013ZL026)

* 通讯作者 Tel: 86-532-88702239; E-mail: zhangzhongfeng@caas.cn

供试菌种:黄瓜炭疽病菌(*Fungus cucumeris anthracnose*)、辣椒炭疽病菌(*Piper anthracnose fungus*)、番茄早疫病菌(*Alternaria solani*)、烟草炭疽病菌(*Colletotrichum micotianae Averno*)、棉花枯萎病菌(*Fusarium oxysporum*)、黄瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporum*)、番茄枯萎病菌(*Tomato Fusarium oxysporum*)、水稻纹枯病菌(*Rhizoctonia solani*)、苹果炭疽病菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)、苹果腐烂病菌(*Valsa mali*)、油菜菌核病菌(*Sclerotinia sclerotiorum*),由杨凌农科大无公害农药研究服务中心及中国农业科学院烟草所植保科提供。

1.2 试验方法

1.2.1 烟草提取物的制备

称取烟草样品 50 g,分别加入提取溶剂(95%乙醇、正己烷)500 mL,浸泡过夜,40 °C 超声提取 30 min,抽滤,残渣再分别加入提取溶剂 500 mL,40 °C 超声提取 20 min,重复两次。提取液合并,浓缩至干,加入 100 mL 95%乙醇溶解,转入试剂瓶中,放入 4 °C 冰箱中保存备用。

1.2.2 抑菌活性测定

采用菌丝生长速率法^[4]测定提取物、一定浓度(提取物中相应浓度)的茄尼醇、绿原酸、芸香苷、烟碱及四种混合物的 95%乙醇溶液对供试真菌的抑制作用,在无菌条件下,将提取物按 1:100 的比例^[5]加入经灭菌后冷却至 45 °C 左右的 PDA 培养基中,混匀,倒板,对照组加入等量的 95%乙醇,每处理重复 3 次。待平板凝固后接入生长一致的菌饼($\varphi = 6.0$ mm),置于 25 °C 恒温培养箱中培养,每隔 24h 观察 1 次,直至对照长至约 2/3 培养皿处,用十字交叉法测量菌落直径。用下列公式计算菌丝生长抑制率^[6]:

$$\text{菌落直径(mm)} = \text{测量菌落直径} - 6.0$$

$$\text{菌丝生长抑制率(\%)} = (\text{对照菌落直径} - \text{处理菌落直径}) / \text{对照菌落直径} \times 100$$

1.2.3 烟草不同溶剂提取物对真菌菌丝生长的毒力测定

分别将提取物稀释成系列浓度 0.5、0.25、0.125、0.08 g/mL,分别吸取不同浓度的提取物按 1:100 的比例加入经灭菌后冷却至 45 °C 左右的 PDA 培养基中混匀配制成含药平板,对照组按 1:100 的比例加入 95%乙醇,每处理重复 3 次。选取受提取物抑制效果最好的三种病原真菌,待平板凝固后接入生长一致的菌饼($\varphi = 6.0$ mm),置于 25 °C 恒温培

养箱中培养,每隔 24 h 观察 1 次,用十字交叉法测量菌落直径,直至对照长至约 2/3 培养皿处。以提取物的浓度对数为横坐标,抑制率几率值为纵坐标做毒力方程,计算提取物对该菌的半效应浓度 EC₅₀。

1.2.4 烟草提取物的化学成分测定方法

1.2.4.1 总生物碱、绿原酸、萜萜亭、芸香苷及茄尼醇的测定方法

总生物碱测定依据 YC/T 160-2002 烟草及烟草制品总生物碱的测定-连续流动法进行;绿原酸、萜萜亭、芸香苷测定依据 YC/T 202-2006 烟草及烟草制品多酚类化合物、绿原酸、萜萜亭和芸香苷的测定进行;烟草茄尼醇的测定采用超高效液相色谱法并依据刘文静等人^[7]研究的测定方法进行。

1.2.4.2 甾醇类(胆固醇、菜油甾醇、豆甾醇等)、VE 及部分萜烯类(新植二烯、西柏三烯二烯)的测定方法

取 0.2 mL 提取物,加 5 mL CH₂Cl₂(加 26 烷和 32 烷内标)和 5 mL 高纯水,离心 10 min,取 CH₂Cl₂ 相过有机相膜,气质联用测定。色谱条件:毛细管柱:DB-5(30 m × 0.32 mm × 1 μm)进样量:1 μL,分流比 3:1;进样口温度 280 °C;检测器温度:280 °C。载气:氦气,载气流速:1.2 mL/min;程序升温:120 °C 保持 4 min,30 °C/min 的速率升至 230 °C,保持 1 min,再以 15 °C/min 的速率升至 250 °C 保持 1 min,最后以 30 °C/min 的速率升至 280 °C 保持 14 min,后运行 5 min。

1.2.5 数据处理

用 DPS v7.05 软件对试验数据进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 鲜烟叶不同溶剂提取物对 11 种植物病原真菌菌落生长的抑制效果

根据 CF87 烤烟材料新鲜烟叶样品正己烷提取物和 95%乙醇提取物对 11 种病原真菌菌落生长抑制作用的研究结果看出(表 1),烟叶正己烷提取物和 95%乙醇提取物对所有供试真菌均有不同程度的抑制作用。烟叶提取物对子囊菌亚门核菌纲——苹果炭疽和半知菌亚门丝孢纲——番茄枯萎、棉花枯萎、黄瓜枯萎的抑制效果较好,抑制率均超过 50%,其中正己烷提取物对苹果腐烂病菌的抑制作用最好,抑制率达到 94%;对担子菌亚门担子菌纲——水稻纹枯的抑制效果最差,抑制率接近 20%。

表1 鲜烟叶不同溶剂提取物对供试菌种的抑制率

Table 1 Inhibitory rate of different solvent extracts of fresh leaves against the tested fungus

供试菌种 Tested fungus	亚门 Subdivision	纲 Class	95% 乙醇提取物 95% Ethanol extract	正己烷提取物 Hexane extract	T 值 T value	P 值 P value
苹果腐烂病菌	子囊菌亚门	核菌纲	74.60%	94.37%	25.168	0.0001
苹果炭疽病菌	子囊菌亚门	核菌纲	57.45%	57.98%	0.7312	0.4974
番茄枯萎病菌	半知菌亚门	丝孢纲	55.07%	63.37%	4.4935	0.0206
黄瓜炭疽病菌	半知菌亚门	腔孢纲	43.52%	52.26%	2.312	0.043
辣椒炭疽病菌	半知菌亚门	腔孢纲	48.13%	50.69%	1.9079	0.1524
油菜菌核病菌	子囊菌亚门	盘菌纲	35.64%	50.29%	7.4186	0.0007
番茄早疫病菌	半知菌亚门	丝孢纲	43.05%	46.17%	2.051	0.1346
烟草炭疽病菌	半知菌亚门	腔孢纲	38.37%	41.08%	1.1776	0.3239
水稻纹枯病菌	担子菌亚门	担子菌纲	17.77%	22.77%	1.238	0.224
黄瓜枯萎病菌	半知菌亚门	丝孢纲	49.80%	56.60%	1.501	0.1937
棉花枯萎病菌	半知菌亚门	丝孢纲	51.54%	57.98%	1.479	0.210

从不同提取溶剂看,正己烷提取物的抑菌活性优于95%乙醇提取物。正己烷提取物对其中8种菌(半知菌亚门2个纲和子囊菌亚门2个纲)——苹果腐烂、苹果炭疽、番茄枯萎、黄瓜炭疽、辣椒炭疽、油菜菌核、棉花枯萎、黄瓜枯萎的抑制率超过50%,而95%乙醇提取物仅对其中4种菌(半知菌亚门1个纲和子囊菌亚门1个纲)——苹果腐烂、苹果炭疽、番茄枯萎、棉花枯萎的抑制率超过50%。相同浓度的两种溶剂提取物对同种受试真菌的抑制率不同,两种提取物对苹果腐烂病菌、油菜菌核病菌的抑制率有极显著的差异;对番茄枯萎病菌、黄瓜炭疽病菌的抑制率有显著的差异。

2.2 鲜烟叶不同溶剂提取物对苹果腐烂病菌、苹果炭疽病菌、番茄枯萎病菌菌丝生长的毒力分析

根据不同浓度的CF87烤烟材料新鲜烟叶样品正己烷提取物和95%乙醇提取物对3种病原真菌(两种溶剂提取物对三种真菌抑制活性最高)菌落生长的毒力分析可知(表2),提取物的浓度对数与抑制率几率值之间线性回归关系显著,回归方程拟合好。正己烷提取物对苹果腐烂病菌的 EC_{50} 为0.185 g/mL(工作浓度1.85 mg/mL),约是苹果炭疽病菌的0.4倍,是番茄枯萎病菌的0.5倍;95%乙醇提取物对苹果腐烂病菌的 EC_{50} 为0.252 g/mL(工作浓度2.52 mg/mL),约是苹果炭疽病菌的0.75倍,是番茄枯萎病菌的0.56倍。

表2 不同溶剂提取物对三种供试菌菌丝生长的毒力

Table 2 Virulence of different solvent extracts against the mycelial growth of three fungus

处理 Treats	植物病原菌 Plant fungi	毒力回归方程 Regression equation	R^2	P 值 P value	EC_{50} (g/mL)
95% 乙醇提取物 95% Ethanol extract	苹果腐烂病菌	$y = 2.238x + 6.34$	1	0.0001	0.252
	苹果炭疽病菌	$y = 1.329x + 5.494$	0.936	0.0324	0.425
	番茄枯萎病菌	$y = 1.755x + 5.606$	0.992	0.0041	0.452
正己烷提取物 Hexane extract	苹果腐烂病菌	$y = 3.456x + 7.531$	0.984	0.0078	0.185
	苹果炭疽病菌	$y = 1.620x + 5.607$	0.974	0.0130	0.422
	番茄枯萎病菌	$y = 2.732x + 6.215$	0.923	0.0390	0.359

注: EC_{50} 为药物安全性指标。
Note: EC_{50} is drug safety index.

2.3 鲜烟叶不同溶剂提取物主要抑菌活性物质及其对植物病原真菌的抑制作用分析

相关文献资料表明,植物中的有效抗真菌成分有多酚类、黄酮类、萜烯类、总生物碱等^[9]。其中烟叶中主要的多酚类物质为绿原酸,主要的黄酮类物质为芸香苷,主要的萜烯类物质为茄尼醇和西柏三

烯二醇,主要的生物碱为烟碱^[8]。由表3可见,CF87烤烟材料新鲜烟叶样品正己烷提取物中未检测到多酚类物质,烟草中存在的主要生物碱—烟碱^[8]及部分萜烯类、甾醇类等物质的含量也低于95%乙醇提取物,但有一种萜烯类物质—茄尼醇^[8]的含量高于95%乙醇提取物。

表3 不同溶剂提取物中多酚类、黄酮类、萜烯类、甾醇类、总生物碱及VE的质量浓度(mg/mL)

Table 3 Concentrations of polyphenols, flavonoids, terpenoids, sterols, alkaloids and VE in different solvent extracts (mg/mL)

	多酚类 Polyphenols				黄酮类 Flavonoids			萜烯类 Terpenoids		甾醇类 Sterols	总生物碱 TA	VE
	绿原酸	新绿原酸	咖啡酸	隐绿原酸	萆蓉亭	芸香苷	茄尼醇	新植二烯	西柏三烯二醇			
正己烷提取物 Hexane extract	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2.28	0.3	5.33	0.31	0.17	0.13
95%乙醇提取物 95% Ethanol extract	1	0.15	0.2	ND	0.05	2.15	2.2	0.42	6.67	0.34	2.22	0.13

注:“ND”表示未检出。

Note:“ND” means not detected.

为进一步确定烟叶提取物中主要抑菌活性物质,作者依照提取物中各成分的浓度配制了相应浓度的茄尼醇、绿原酸、芸香苷、烟碱、茄尼醇绿原酸混合溶液及四种物质的混合溶液,并测定了它们对苹

果腐烂和油菜菌核病菌(两种溶剂提取物对两种真菌抑制率差异为极显著)的抑菌活性,结果如表4所示。

表4 不同纯物质溶液对苹果腐烂病菌和油菜菌核病菌的抑制率

Table 4 Inhibitory rate of different pure substance solution against *V. mali* and *S. sclerotiorum*

	茄尼醇 Solanesol	烟碱 Nicotine	芸香苷 Rutin	绿原酸 Chlorogenic acid	绿原酸、茄尼醇混合液	芸香苷、绿原酸、
					Solanesol and Chlorogenic acid mixed solution	烟碱、茄尼醇混合液 The 4 substances mixed solution
苹果腐烂病菌 <i>V. mali</i>	-7.41%	4.54%	10.89%	4.92%	-0.92%	-4.44%
油菜菌核病菌 <i>S. sclerotiorum</i>	-3.99%	-3.91%	-1.75%	-6.82%	1.57%	-4.85%

注:抑制率“-”值表示为促进作用。

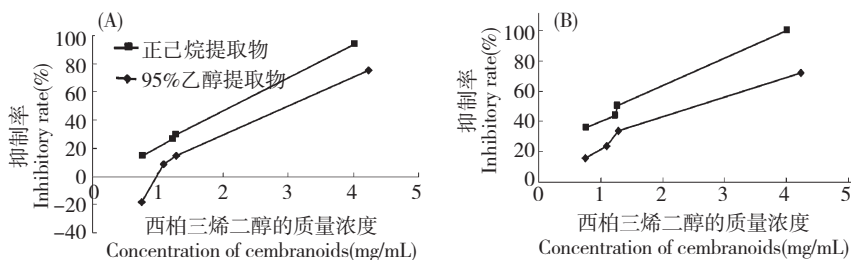
Note:“-” value is expressed as a promoting effect.

由表4可知,不同的纯物质溶液对相同真菌的抑制率不同,同种纯物质溶液对不同真菌的抑制率也不同。所测定的几种纯物质溶液及其混合液对供试真菌的抑制率均较低且部分溶液对供试真菌的生长具有促进作用。这表明所测的几种纯物质不是烟叶提取物中主要的抑菌活性物质,因而推测西柏三烯二醇可能是烟叶提取物中主要的抑菌活性物质。由于现在尚无市售的西柏三烯二醇纯品,因此作者初步选用西柏三烯二醇含量差异较大的四份烟草材料:革新3号、CF87、FC8(04-5002)净叶黄鲜烟叶,分别测定了其95%乙醇、正己烷提取物对两种真菌的抑菌活性。各样品提取物中西柏三烯二醇含量与提取物的抑菌活性之间的关系如图1所示:

由图1可以看出,不同溶剂提取物对两种供试真菌的抑菌活性均随西柏三烯二醇浓度的增加而增大,说明西柏三烯二醇可能是烟叶提取物中主要的抑菌活性物质。

3 讨论与结论

研究表明,0.5 g/mL(工作浓度5 mg/mL)的正己烷提取物对半知菌亚门2个纲和子囊菌亚门2个纲的真菌的抑制率超过50%,其中对苹果腐烂病菌的抑制率为94.37%。通过对苹果腐烂病菌的毒力测定显示:正己烷提取物和95%乙醇提取物对苹果腐烂病菌的EC₅₀分别为0.185 g/mL(工作浓度1.85 mg/mL)、0.252 g/mL(工作浓度2.52 mg/



A: 苹果腐烂病菌 (*V. mali*); B: 油菜菌核病菌 (*S. sclerotiorum*)

图1 西柏三烯二醇含量与提取物的抑菌活性之间的关系

Fig. 1 The relationship between cembranoids content and extracts' antifungal activity

mL)。孟晶岩等人测定了黄芩、黄柏的乙醇和石油醚提取物对苹果腐烂病菌的抑制作用^[10],其测定结果中对苹果腐烂病菌抑制作用最强的提取物为0.2 g/mL的黄柏石油醚提取物,而它的抑制率仅为27.22%;2 g/mL的茄科植物——锦灯笼、洋金花的丙酮提取物对苹果腐烂病菌的抑制率为0^[11]。说明烟叶提取物作为植物源抑菌剂,具有开发利用价值。

两种溶剂的烟叶提取物对供试真菌均有不同程度的抑制作用,而且同浓度的正己烷提取物比95%乙醇提取物的抑制效果好,说明烟草叶片中存在丰富的杀菌抑菌活性物质,相同的抑菌活性物质对不同的真菌以及不同的抑菌活性物质对相同的真菌抑制效果不同。通过测定提取物中多酚类、黄酮类、萜烯类等抑菌活性物质的含量及部分纯物质抑菌活性,表明具有抑菌活性的物质对真菌的抑制作用不是绝对的,在一定浓度时可能对真菌的抑制作用微弱,甚至具有促进作用。林学政等人研究表明,绿原酸作为植保素的一种,在较高浓度时在体外对疫霉菌、立枯丝核菌等真菌孢子的萌发具有明显的抑制作用,而且其抑制作用因病原菌不同而存在着明显的差异;当工作浓度小于1 mg/mL时,对孢子的萌发基本上没有影响^[12]。胡尚勤研究发现,烟碱含量在3%以上时对细菌有明显的抑制作用,如果烟碱浓度很低或微量存在时,不但无抑菌作用,反而会作为真菌的营养物质之一^[13]。

大量文献资料表明,植物中具有抗真菌作用的天然活性成分有多酚类、黄酮类、萜烯类、生物碱类等^[14,15]。本试验所测定的几种烟草中抗真菌活性成分的纯物质溶液及其混合液对两种真菌的抑制效果都不佳,而提取物的抑菌活性却随西柏三烯二醇含量的增加而增高,这表明所测的几种纯物质不是烟叶提取物中主要的抑菌活性物质,而初步测定的西柏三烯二醇可能是烟叶提取物中主要的抑菌活性

物质。有关研究报道,萜烯类化合物4-表-松香醇和7,13-松香二烯-3-酮对菜青虫毒杀活性较高^[16];甘遂二萜类化合物中C-13有长链酰基的Ingenol衍生物有显著的体内抗病毒活性^[17]。据此下一步我们将提取纯化西柏三烯二醇^[18],并对其抑菌活性及抑菌机理进行进一步的研究。

参考文献

- 1 Yang YP(杨玉萍). Research Advances on Botanical Fungicides. *J Agric Sci Tech*(中国农业科技导报),2006,8:49-53.
- 2 Guo Y(郭毅),Ni JR(倪晋仁),Huang W(黄文). Comparison on bioactivities of solanesol extracted from tobacco leaves by different methods. *J Anhui Agric Sci*(安徽农业科学),2008,36:6356-6359.
- 3 Hu SQ(胡尚勤). Research of the nicotine to disinfect pathogenic bacteria affects. *Biol Tech*(生物技术),2009,19(5):73-75.
- 4 Fang ZD(方中达). *Plant Disease Research Method*(植病研究方法). Beijing:China Agriculture Press,1998.
- 5 Ministry of Agriculture of the People's Republic of China(中华人民共和国农业部). Test standards of indoor biological pesticide-Fungicides(农药室内生物测定试验准则 杀菌剂). 2006-07-10.
- 6 Zhang XH(张新虎),He J(何静),Shen HM(沈慧敏). The study on the action mechanism of the extraction from *Xanthium sibiricum* to *Botrytis cinerea* Pers. *Pratac Sci*(草业学报),2008,17(3):99-100.
- 7 Liu WJ(刘文静),Weng BQ(翁伯琦),Zhang WX(张望兴),et al. Determining solanesolin in tobacco leaves and its extracts using HPLC standardized method. *Chin Tob Sci*(中国烟草科学),2013,34(4):60-66.
- 8 Su DC(苏德成),Wang YY(王元英),Wang SS(王树声),et al. *Chinese Tobacco Cultivation*(中国烟草栽培学). Shanghai:Shanghai Science and Technology Press,2005. 70-79.